

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

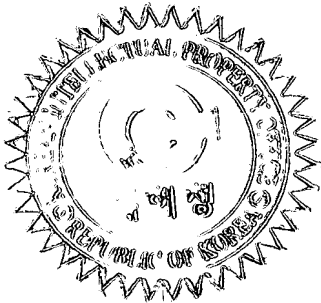
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2003-0017447
Application Number

출원년월일 : 2003년 03월 20일
Date of Application MAR 20, 2003

출원인 : 김철호
Applicant(s) KIM CHEORL-HO



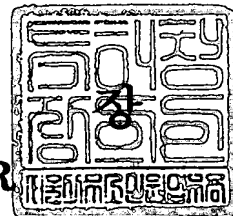
2003 년 06 월 12 일

특

허

청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.03.20
【발명의 명칭】	임신 가능성 진단키트 및 진단방법
【발명의 영문명칭】	A pregnancy diagnostic Kit and Method thereof
【출원인】	
【성명】	김철호
【출원인코드】	4-1998-045750-7
【대리인】	
【명칭】	특허법인 원전
【대리인코드】	9-2000-100001-9
【지정된변리사】	이택순 , 강성혜
【포괄위임등록번호】	2002-023234-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김철호
【성명의 영문표기】	KIM,Cheorl Ho
【주민등록번호】	620512-1009519
【우편번호】	706-100
【주소】	대구광역시 수성구 범물동 1269번지 보성맨션 201-407
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이동목
【성명의 영문표기】	LEE,Dong Mok
【주민등록번호】	700502-1788210
【우편번호】	791-753
【주소】	경상북도 포항시 북구 두호동 두호주공아파트 16동 201호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	정태욱
【성명의 영문표기】	CHUNG,TAE-WOOK
【주민등록번호】	730919-1090921



1020030017447

출력 일자: 2003/6/13

【우편번호】	600-111
【주소】	부산광역시 중구 영주1동 555번지
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	고정현
【성명의 영문표기】	KO, Jeong Heon
【주민등록번호】	621228-1951028
【우편번호】	305-761
【주소】	대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 207동 902호
【국적】	KR
【심사청구】	청구
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 특허법인 원전 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	19 면 29,000 원
【가산출원료】	0 면 0 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	5 항 269,000 원
【합계】	298,000 원
【감면사유】	개인 (70%감면)
【감면후 수수료】	89,400 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통

**【요약서】****【요약】**

본 발명은 임신가능성을 조기에 진단할 수 있는 방법 및 진단키트에 관한 것으로서, 본 발명자들은 시험관아기시술 환자를 대상으로 난포액을 회수하여 MMP의 활성을 조사한 결과 MMP-9 활성이 없거나 낮은 군에서는 전혀 임신이 되지 않으며, MMP-9 활성이 일정 정도 이상인 군에서는 임신율이 50-60%정도로 나타났다. 따라서, 본 발명의 진단방법 및 진단키트를 이용하면 생식보조시술법에서 난포액으로 MMP-9의 발현정도를 조기에 자이모그래피(zymography)로 검정하여 임신가능성을 예측할 수 있으므로, 생식보조시술법의 효율성을 재고할 수 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

MMP-9, 착상율, 임신율, 자이모그래피, 진단키트



【명세서】

【발명의 명칭】

임신 가능성 진단키트 및 진단방법{A pregnancy diagnostic Kit and Method thereof}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 인간 난포액에서의 MMP-9 및 MMP-2의 활성을 자이모그래피 분석으로 측정한 사진이다.

시료들은 0.1% 젤라틴이 포함된 7.5% SDS-PAGE 젤 상에서 전기이동시켜 세척하고 자이모그래피 인큐베이션 완충액에서 오버나잇하여 젤라틴이 절단(digest)되도록 하였다. A는 MMP-9 활성에 대한 자이모그래피이다. B는 MMP-2 활성에 대한 자이모그래피이다. 라인 C = MMP-9 대조군(control), 라인 1-5 = 임신군(pregnancy), 라인 6-10 = 비임신군(nonpregnancy).

도 2는 시험관 수정의 난포액에서 proMMP-9의 발현과 임신율(pregnancy rate)의 관계를 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 연구대상 환자들의 불임원인과 MMP-9 발현 사이의 관계를 나타낸 그래프이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<5> 1979년에 최초의 시험관아기가 태어난 이후 불임환자를 치료하는 다음과 같은 다양한 생식보조기술법(assisted reproduction technology; ART)이 개발되어 응용단계에 이르렀다. 즉, 시험관내 수정-배아이식(in vitro fertilization-embryo transfer; IVF-ET), 세포질 내 정자 주입(intracytoplasmic sperm injection; ICSI), 고환 내의 정자 추출법(testicular sperm extraction; TESE), 정자세포 주입(round spermatid injection; ROSI) 및 배아 냉동(embryo freezing)법 등이 그것들이다. 현재 생식보조기술법은 여러가지 원인의 불임치료에 중요하고 보편적인 방법으로 자리를 잡아가고 있으나 고비용, 복잡한 과정 및 낮은 성공률 등이 문제점으로 남아 있다.

<6> 생식보조기술이 점차 증가하고 있으나 그중에서 IVF 등의 임신율은 최근까지 대체로 증가추세이지만 기대한 만큼의 상승은 없고 실제 출산율(take home baby rate)은 15-30%정도이다. 통계에 의하면 미국에서 1985년 IVF에 의한 임신율은 주기당 23.8%이었고, 분만율은 주기당 19.3%에 지나지 않았으며, 1997년 통계에 의하면 임신율은 주기당 29.3%, 분만율 24.0%로 높아졌다. 그러나 1996년과 1997년 통계에서 차이가 없었다.

<7> 생식보조기술동안 성공적인 인간의 임신은 난포발달, 회수된 난자수, 수정, 수정란의 발달 그리고 착상에 의존한다(Sakkas D, et al., 2001). 그중에서 자궁 내막에 배반포의 착상은 자궁내막과 수정란의 발달에서 구조적인 변화에 의존하는 복잡한 과정이다. 조직 재형성은 자궁의 준비, 자궁내막의 수정란 파열 그리고 연속적인 자궁내막기질의

출현이 요구된다. 설득력 있는 증거들이 MMPs가 이 과정동안 ECM성분의 파괴를 위해 필수적이라는 가설을 뒷받침해 주고 있다. 이런 관점에서 MMP-9은 발생과정에서 세포의 감수분열, 침투 그리고 조직의 재형성 등과 관련있는 것으로 추측된다. 즉, MMP는 ECM(extracellular matrix)의 변화를 유발하여 생리주기에 따른 내막조직의 변성(remodeling)에 관여한다고 알려져 있으며 또한 MMP분자들은 생리주기에 따라 다양한 발현양상을 보이며 배란 및 착상과정에 관여한다.

- <8> 92kDa 타입 IV 콜라게나아제/젤라티나아제 B(typeIV collagenase/gelatinase B)로 알려진 MMP-9(matrix metalloproteinase-9)는 많은 종류의 콜라겐(IV, V and XI), 엘라스틴, 프로테오글라이칸 그리고 젤라틴을 분해한다(Hibbs et al., 1985; Murphy et al., 1991). 더욱이 앞의 연구자들은 인간 경부 피브로블라스트(cervical fibroblasts)(Sato, H. and Seiki, M., 1993), 영양세포(trophoblasts)(Shimonovitz, S. et al., 1996) 그리고 자궁내막 기질세포(endometrial stromal cells)(Huang, H.A., et al., 1998)에서 분비되는 MMP-9은 호르몬과 사이토카인에 의해 자극된다는 것을 입증하였다. MMP-9은 생리주기, 배란, 착상, 분만 그리고 수유 후 유선의 퇴축 같은 여성의 복잡한 주기적인 변화에 관여한다고 제안되었다(Jeziorska, M., et al., 1996 ; Librach, C.L. et al.1991; Vadillo-Ortega, F. et al.,1995). 배란은 뇌하수체로부터 LH가 상승하여 일어나는 과정이다. 그 결과 난소의 난포에서 성숙된 난자가 배출된다. 이러한 과정에서 포괄적인 조직형성이 요구되며, MMP-9은 배란시 필요한 단백분해과정을 야기시키는데 중요하다. 그러나 인간의 난포액과 MMP-9사이의 관계에 관해서는 밝혀진 바가 없다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <9> 따라서, 본 발명은 시험관 수정 등의 생식보조기술 방법에 있어서 임신 가능성을 확인할 수 있는 진단키트 및 방법을 제공하려는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- <10> 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명자들은 시험관아기기술 환자를 대상으로 난포액을 회수하여 MMP를 조사한 결과 MMP-9이 발현되지 않는 군에서는 전혀 임신이 되지 않으며, MMP-9를 발현하는 군에서는 임신율이 50-60%정도로 나타났다. 따라서, 생식보조기술법에서 조기에 난포액으로 MMP-9의 발현정도를 조기에 자이모그래피(zymography)로 검정하여 임신가능성을 예측할 수 있었다. 즉, 배란전 난포에서 MMP-9의 발현이 생식보조기술동안 임신과의 관계를 조사하였다. 연구결과 배란전 난포액에서의 높은 MMP-9의 발현은 높은 착상률 및 높은 임신율에 관계가 있었다.
- <11> 본 발명은 성숙한 난자를 갖고 있는 난포의 난포액을 분리하고 난포액에 포함된 MMP-9 효소의 활성을 측정하여 임신 가능성을 진단하는 방법에 관한 것이다.
- <12> 또한, 본 발명은 상기 MMP-9의 효소 활성을 자이모그래피법으로 측정하는 것을 특징으로 한다.
- <13> 또한, 본 발명은 입경 17mm 이상의 난포를 선택하여 MMP-9 활성을 측정하는 것을 특징으로 한다.

1020030017447

- <14> 뿐만 아니라, 본 발명은 MMP-9에 의해 분해되는 단백질 기질을 포함하여 제조되는 폴리아크릴아미드 젤을 이용하여 난포액 내의 MMP-9 효소 활성을 측정할 수 있는 임신가능성 진단키트에 관한 것이다.
- <15> 또한, 본 발명은 MMP-9에 의해 분해되는 단백질 기질이 콜라겐 IV, 콜라겐 V, 콜라겐 XI, 엘라스틴, 프로테오글리칸 및 젤라틴 중에서 선택되는 것임을 특징으로 한다.
- <16> 발생주기와 임신동안 여성의 내분비 상태의 변화는 자궁에서 포괄적인 조직 재형성의 결과이다(Wewer et al., 1986; Aplin et al., 1988). 예를 들어서, 자궁에 있는 type IV 콜라겐, 라미닌(laminin), 피브로넥틴(fibronectin), 그리고 프로테오글라이칸 (proteoglycan)과 같은 여러가지 기저막 성분들은 월경주기와 임신을 통하여 변화를 수반하게 된다(Aplin et al., 1988). 유사하게, 생쥐의 자궁내 기질 세포(stromal cell)도 이 과정 중에 세포외 매트릭스 성분들의 리모델링(Wewer et al., 1986)이 이루어진다. 이때, MMP류와 TIMP류가 배란, 착상 및 탈락막 과정에 매트릭스를 분해하는 핵심매개인자로 생각되어 왔다(Behrendtsen et al., 1992; Cross et al., 1994; Lefebvre et al., 1995; Harvey et al., 1995; Leco et al., 1996; Alexander et al., 1996).
- <17> 본 발명에서는 배란중 사람난포액(follicular fluid)에 존재하는 MMP-9 효소활성을 젤라틴 기질 자이모그래피(gelatin substrate zymography) 기술을 통하여 증명하였으며 MMP-9 효소활성이 임신그룹에서 비임신그룹에 비하여 유의성있게 증가함을 발견하였다($P < 0.01$). 그러나, 세포의 리모델링에 관여하는 것으로 알려진 또다른 효소인

MMP-2 효소활성은 2가지 그룹 즉, 임신군과 비임신군 모두에서 높게 발현되어 차이는 존재하지 않았다. 각 그룹에서 측정한 MMP-9 효소활성들을 밀도측정(densitometry) 기기를 사용하여 수치화하여 비교한 결과, 임신군의 평균 MMP-9 효소활성은 61,759units이었으며, MMP-9 활성은 임신을 위한 전제조건임을 발견하였다.

<18> 많은 연구자들은 MMP의 역할이 조직형성과 많은 생물학적 조직 치료 그리고 배란, 염증, 관절염, 상처치료, 종양침투, 형태형성 같은 병리학적 상태에 중요하다고 제안한다(Behrendtsen et al., 1992; Cross et al., 1994; Lefebvre et al., 1995; Harvey et al., 1995; Leco et al., 1996; Alexander et al., 1996). 하지만 생리학적으로 요구되는 MMP와 체내에서 발생된 단백질의 기질에 관해서는 아직 명확하지 않다. 난포액에서 콜라겐 타입 IV를 포함한 기질 특성을 가진 MMP-9의 출현은 난포 성장과 발달동안 조직 재형성을 요구한다. 배란은 조절된 효소의 파열과 난포벽에서 콜라게나아제(collagenases)의 손실로서 일어난다(Espey, 1994; Luck and Zhao, 1995).

<19> 사람이 아닌 다른 종의 배란에서도 중요한 콜라겐 분해효소들은 자궁의 강직성 구조조직인 섬유상 콜라겐형태를 분해하는 MMP-1과 같은 fibrillar collagenase를 포함한다. MMP-9 발현은 마우스와 인간의 pre-implantation embryo, EC 세포들, 그리고 포배 생물(blastocyst outgrowth)에서 자이모그래피, 면역조직화학 (immunocytochemistry) 그리고 RCR에 의해 검출되었다. 마우스와 인간의 착상전 수정란 EC cells과 포배(blastocyst) 등에서의 MMP-9 발현은 발견되었다. 피브로블라스트 성장인자-4(Fibroblast growth factor-4)의 출현에서 포배 배양은 MMP-P의 분비를 증가시켰다. MMP-P은 수정란 착상동안 마우스의 포배와 영양배엽 세포층(cytotrophoblast cell)에 있어서 점진적으로 올라가는 것을 보았다.

1020030017447

<20> 본 연구에서는 수정에서 8-세포기까지 분열동안 MMP-9의 발현은 세포분열에 따른 차이가 없었다. 그러나 그 이후 착상기간동안 MMP-9의 발현은 필요할 것으로 사료된다. 한편 성공적인 임신은 착상시에 탈락막(decidua)에서 영양배엽(trophoblast)의 침투에 의존한다. 그리고 그 결과 자궁벽에 세포외 영양배엽(extracellouous trophoblast)이 침투할 것이다(Fisher et al., 1985; Librach et al., 1991; Cross et al., 1994). 이러한 사건들은 세포의 기질의 파괴와 세포의 이동이 요구된다. Rat와 인간의 태반에서 MMP-9의 농도는 분만과 함께 증가되었다(Bryant-Greenwood and Yamamoto, 1995; Draper et al., 1995; Lei et al., 1995).

<21> 본 연구는 MMP-9이 발현되지 않는 난포액에서는 임신이 되지 않는 것을 입증하였다. 그것은 착상과 임신상태에서 MMP-9 발현이 필수적이며 또한 배란시에 MMP-9이 관련되며 만약에 배란시에 MMP-9이 발현되지 않으면 착상과 임신때에 발현이 어려울 것으로 사료된다. 결론적으로 MMP-9의 활성화는 난포의 성장과 발달에 있어서 세포의 기질 파괴, 난포의 이동과 배란 그리고 다른 세포의 작용을 조절하는데 중요한 역할을 한다.

<22> 아래에서는 구체적인 실시예를 통하여 본 발명의 구성을 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명의 범위가 실시예의 기재에만 한정되는 것은 아니다.

<23> <재료 및 방법>

<24> 연구대상

<25> 동국대학교 병원 여성인공수정 (IVF) 프로그램에 따라 다양한 불임의 문제를 가진 54명의 환자가 본 연구에 포함되었다. 불임의 원인별로 난관인자(n=15), 자궁내막증(n=11), 무배란(n=9) 그리고 원인불명의 불임(n=19)이다. 그리고 환자들의 나이는 21-33세였다(평균 31.3세). 한편 남성불임인자 즉 무정자증, 희소정자증 등이 동반된 경우는 본 연구 대상에서 제외되었다.

<26> <생식보조기술 과정>

<27> 1. 난자의 준비

<28> 과배란은 생식선자극호르몬 분비 호르몬 아고니스트(gonadotropin releasing hormone agonist)(GnRH-a)를 장기요법으로 사용하였다. 즉 황체기 중기에서부터 900 buserelin(Hoechst, Germany)을 비강분무 투여하여 뇌하수체를 억제시킨 후 난포기 3~5 일째부터 human menopausal gonadotropin(hMG, Pergonal, Serono 또는 IVF-M, LG, Korea)을 투여하였다. 질식 초음파를 이용한 난포의 반응에 따라 hMG의 투여량을 조절하여 난포의 직경이 17mm이상인 것이 2개 이상일 때 10,000IU의 인간 융모막 생식선자극호르몬(human chorionic gonadotropin)(hCG, IVF-C, LG, Korea)을 투여하여 배란을 유도하였다. hCG주사 36시간 후에 질식 초음파를 이용하여 난포를 흡입, 난자를 채취하였다. 채취한 난자는 37℃와 5% CO₂로 조절된 조작기(IVF chamber, USA) 내에서 해부현미경(SMZ-10, Nikon, Japan)을 이용하여 난구세포의 특징과 세포질 내의 GV유무를 기준으로 난자의 성숙정도를 확인한 다음, 10% SSS를 첨가한 P₁ 배지가 들어 있는 배양접시(3037,

1020030017447

Falcon, USA)로 옮겨 수정시기까지 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 수정에 이용하는 난자는 배양접시당 5개 이하가 되도록 조절하였다.

<29> 2. 체외수정

<30> 정자는 난자를 채취하고 나서 수음으로 specimen container(Baxter, USA)에 정액을 회수하였다. 정자의 농도와 운동성은 WHO의 기준에 따라 측정하였다. 정액을 실온에서 10~20분간 방치하여 액상화를 유도하였다. 액상화된 정액은 15ml 코니칼 튜브(cornical tube)(2099, Falcon, USA)로 옮긴 다음, 10% SSS가 첨가된 Ham's F-10으로 1,500rpm에서 2회(5분, 3분) 원심분리하였다. 원심분리 후 펠렛(pellet)을 제외한 상층액은 제거하고 펠렛이 흩어지지 않게 1ml의 10% SSS가 첨가된 Ham's F-10을 조심스럽게 첨가하여 30분 동안 배양기 내에서 정자를 부유하였다. 부유된 정자는 5ml tube(2003, Falcon, USA)에 보관하면서 수정에 이용하였다. 수정에 이용하는 정자는 $1 \times 10^5/\text{ml}$ 마리가 되게 수정시기의 난자가 들어있는 배양액 내로 주입하였다. 다음날 아침 37℃와 5% CO₂로 조절된 조작기 내에 있는 해부현미경 하에서 주사바늘(syringe needle)(320310, BD, USA)을 이용하여 난구세포를 제거하고 수정여부를 조사하였다. 자성전핵과 융성전핵이 형성되어 있고 두 개의 극체가 있는 것을 수정이 된 것으로 확인하였다.

<31> 3. 배아이식

<32> 정상적으로 수정이 이루어진 난자만을 선별하여 P1 배양액에서 48시간을 배양한 후 8-세포기 이상의 난자를 2-5개 선별하여 이식하였다. 이식에는 대부분의 경우 Tomcat catheter(8890-793021, Sherwoo, USA)를 이용하였다.

<33> 4. 황체호르몬의 투여 및 임신의 확인

<34> 배아 이식후 매일 100mg의 황체호르몬(progeterone in oil, Progest, Samil, Korea)을 근육 주사하고 이식 후 10일경 혈중 β -hCG의 농도가 10mIU/ml 이상일 때 화학적 임신으로 정의하였다. 배아 이식 후 3주 경에 질식 초음파 검사에서 태낭이 확인되는 경우를 임상적 임신으로 정의하였다.

<35> <실시예 1: 난포액의 준비>

<36> 난포액은 IVF체외수정시술을 하고 있는 환자 중에서 성숙 난자를 갖고 있는 난포(18mm이상)에서 초음파 흡입(ultrasound-guided aspiration) 방법으로 회수한 난포액에 혈액이 거의 섞이지 않은 것을 회수하여 이용하였다. 회수한 난포액은 원심분리(3,500 rpm)를 30분간 실시하여 혈구세포와 과립구세포들을 제거한뒤 상층액만을 회수한 후 0.2 μ m의 여과기로 제균한 후 -20℃를 유지하고 있는 냉장고에 보존하다가 용해하여 사용하였다.

<37> <실시예 2: 자이모그래피(zymography)법을 이용한 MMP-9 효소활성 측정>

<38> 난포액에서의 MMP-2와 MMP-9의 발현은 Rawdanowicz et al.(1994)의 설계에 Riley et al.(1999)의 내용을 수정한 자이모그래피를 사용하여 확인하였다. 난포액은 1mg/ml의 젤라틴이 포함된 SDS-PAGE(7.5% (w/v) gels; Minigel apparatus; Bio-Rad, Hemel Hempstead) 사용하여 분리하였다. 그리고 젤을 2.5%(v/v) Triton X-100에 2번 세척하고 소화완충액(digestion buffer; 200mM NaCl, 50mM Tris-HCl, 2.5 mM CaCl₂, 1mM ZnCl₂, pH 7.6; all chemicals from Sigma Chemical Co, St Louis, MO)에 넣어 37℃에 18시간 보관하였다. 젤의 염색은 염색용액(0.5% (w/v) Coomassie blue R250 (Bio Rad, Richmond, CA) in 30%(v/v) methanol 10% (v/v) glacial acetic acid in H₂O)으로 실온에서 염색하였다.

<39> <실시에 3: 자이모그래피 후 MMP-9 효소활성의 수치화>

<40> 젤라티나아제(Gelatinase) 활성은 젤을 스캐닝한 후 띠(band)층의 세기와 표면을 측정하는 Gel Documentation semi-automated image analysis(Core-Bio System, Seoul, Korea)를 사용하여 양을 측정하였다.

<41> <통계>

<42> 결과는 적어도 3반복에 의한 평균으로 했으며 평균에 대한 유의성은 Student's t-test를 실시하였다. $P < 0.05$ 인 경우 통계학적 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

<43> <결과>

<44> 난포액에서 MMP-9 효소활성은 SDS-PAGE zymography에서 92kDa에 나타났으며 자이모 그래피에 의해 입증된 것처럼 MMP-9 활성이 일치하였다(도 1). 임신군의 MMP-9 효소활성은 비임신군에 비하여 유의적으로 MMP-9 효소활성이 높았다($P < 0.01$).

<45> 그러나, 72kDa 크기에 존재하는 MMP-2 효소활성은 모든 시험대상 여성에서 채취한 난포액에서 일정하게 높은 효소활성이 검출되어 임신군과 비임신군간의 차이가 없었다(도 2).

<46> 본 시험대상 여성들의 평균연령은 31세(± 3.3)이었다. 모든 시험대상군에서 한번 처리주기 후 난자를 성공적으로 회수하였다. 난자 회수는 hCG를 주사후 36-37시간에 수행하였다. 임신군의 평균 수정율은 71.82%(± 1.7). 임신이 되지 않는 비임신군은 69.1%(± 13.1)이었다. 그 결과로 모든 여성은 2-7개의 수정란을 이식했다. 16명이 화학적 임신으로 확인되었고 그 중 1명은 유산이 되고 15명은 계속 진행되어 분만했다. 나이에 따른 임신군과 비임신군 사이의 차이는 없었다. 평균 나이는 각각 29(± 3.3)과 31(± 3.2)였다(표 1).

<47> 【표 1】

Variable	Pregnant (n=16)	Non-pregnant (n=38)
No. of cycles	16	38
Age (years)	29 \pm 3.3	31 \pm 2.3
No. oocytes/patient	13.4 \pm 1.2	13.5 \pm 1.4
% Fertilization	65.9 \pm 17.3	67.3 \pm 17.2
No. embryo transfer	4.7 \pm 0.9	4.7 \pm 0.6
Duration of infertility (years)	2.2 \pm 0.9	1.9 \pm 0.6
Mean (\pm SD) MMP-9 activity(densitometry)	61,759 \pm 4800	47,021 \pm 7981

All values are means \pm SD

<48> 난포액에 존재하는 MMP-9 효소활성을 측정한 결과 임신군의 평균 MMP-9의 효소활성은 61,759 densitometric unit였다. 전체 54명의 여성이 본 시험대상군에 포함되었는데 각 그룹의 분류를 보면 난관 인자(Tubal factor)(n=15), 자궁내막증(endometriosis; n=11), 원인불명(n=19) 그리고 무배란(anovulation; n=9)이었고, 각그룹의 평균 MMP-9 효소활성정도를 비교하였다(도 3). 도 3에서 알 수 있듯이 무배란군에서의 MMP-9 효소활성은 다른 세 그룹에 비해 유의하게 낮았다($p<0.001$).

<49> 한편, 최종적인 전체 착상율(implantation rate)과 임신율(pregnancy rate)은 각각 18.6%와 29.6%였다. 표 2에서는 MMP-9의 효소활성의 정도에 근거하여 임의적으로 4가지 군으로 분류하여 임신율과 착상율을 구분하였다. 제1군의 MMP-P효소활성도는 30,000 ~ 40,000 unit, 제2군은 40,000 ~ 50,000 unit, 제3군은 50,000 ~ 60,000unit 그리고 제4군은 60,000 unit이상으로 구분하였다.

<50> 흥미롭게도 MMP-9 효소활성 수준이 50,000unit 이하일 때 착상율과 임신율은 모두 0%이었다. 대조적으로 MMP-P 효소활성 수준이 50,000unit 이상일 때 착상율과 임신율은 각각 32.15와 47.3%였으며 MMP-9 효소활성이 높을 때에만 착상과 임신이 성공적이었다. MMP-9 효소활성 50,000 unit이하에서는 착상과 임신은 모두 이루어지지 않았다. 따라서, 본 발명자들은 MMP-9 활성이 존재하여야만 착상과 임신이 이루어진다는 사실을 제시하였다(표 2).

<51>

<51>1020030017447

【표 2】

Variable	MMP-9 densitometric unit ($\times 10^3$)			
	30-40	40-50	50-60	60-70
Implantation rate (%)	0/49(0)	0/62(0)	28/87(32.1)	21/65(32.3)
Pregnancy rate (%)	0/10(0)	0/10(0)	9/19(47.3)	7/15(46.6)

【발명의 효과】

<52> 본 발명에 의하면, 생식보조시술법에 있어서 실제 출산까지 이어지는 확률이 낮은 문제점을 해결하고, 임신 가능성 여부를 초기에 진단할 수 있다.

<53> 또한, 본 발명에 의하면 MMP-9이 발현되지 않는 군을 분류하여 종래의 생식보조시술법에 앞서 임신율을 높일 수 있는 새로운 치료법을 찾아낼 수 있게 된 것이다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

성숙한 난자를 갖고 있는 난포의 난포액을 분리하고 난포액에 포함된 MMP-9 효소의 활성을 측정하여 임신 가능성을 진단하는 방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서, MMP-9의 효소 활성은 자이모그래피법으로 측정하는 것을 특징으로 하는, 임신 가능성을 진단하는 방법.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 난포는 입경 17mm 이상인 것을 선택하는 것을 특징으로 하는, 임신 가능성을 진단하는 방법.

【청구항 4】

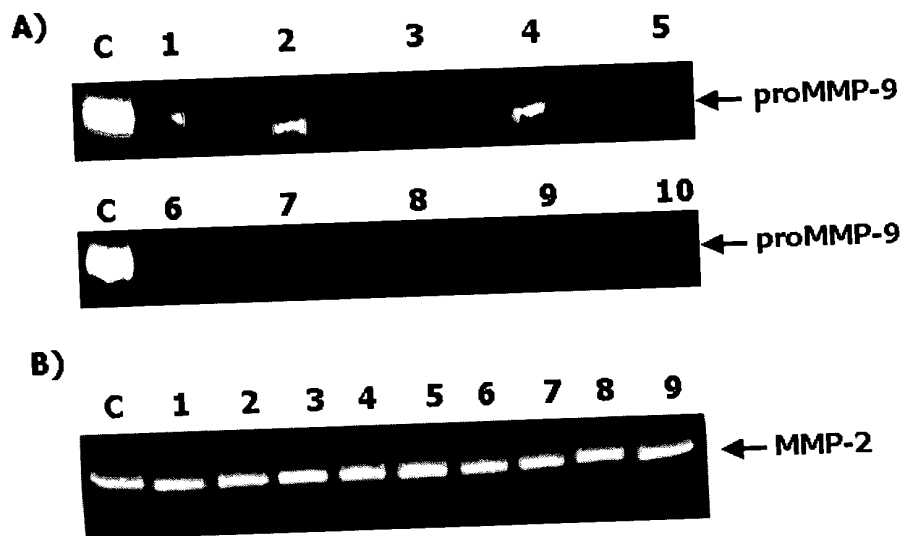
MMP-9에 의해 분해되는 단백질 기질을 포함하여 제조되는 폴리아크릴아미드 겔을 이용하여 난포액 내의 MMP-9 효소 활성을 측정할 수 있는 임신가능성 진단키트.

【청구항 5】

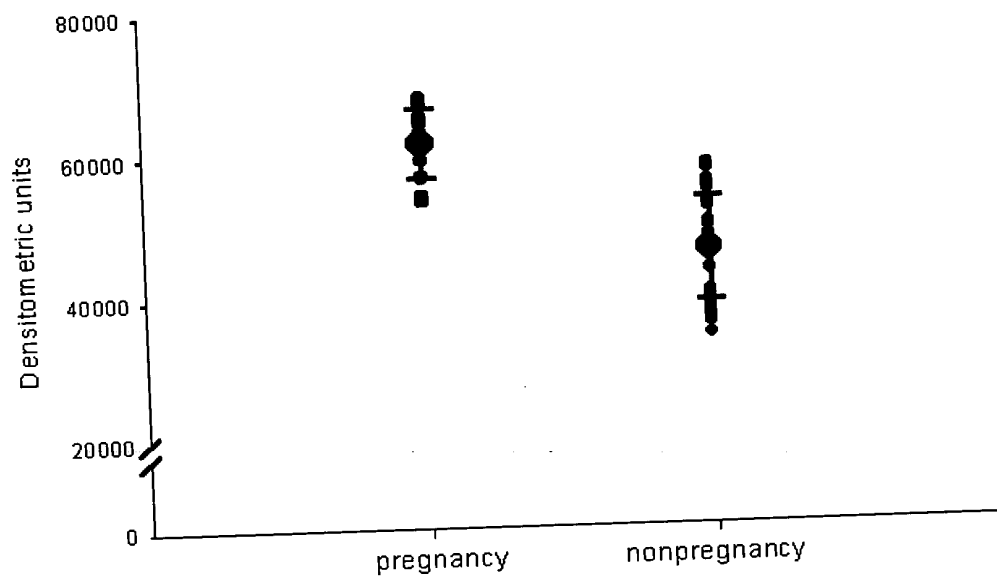
제4항에 있어서, MMP-9에 의해 분해되는 단백질 기질은 콜라겐 IV, 콜라겐 V, 콜라겐 XI, 엘라스틴, 프로테오글리칸 및 젤라틴 중에서 선택되는 것임을 특징으로 하는, 임신가능성 진단키트.

【도면】

【도 1】



【도 2】



【도 3】

